

NUCLEIC ACID PROBES**Publication number:** JP4501959T**Publication date:** 1992-04-09**Inventor:****Applicant:****Classification:****- International:** C12Q1/44; C12N15/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; C12Q1/44; C12N15/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; (PC1-7) C12N15/10, C12N15/11, C12Q1/44; C12Q1/48, C12Q1/68**- European:** C12N15/10D; C12Q1/68A6, C12Q1/68B; C12Q1/68B10, C12Q1/68D4, C12Q1/68D6; C12Q1/68E; G01N33/543D4**Application number:** JP19890501005 19891121**Priority number(s):** GB19880027157 19881121, GB19880027158 19881121, GB19880027159 19881121; GB19880027160 19881121; GB19880027166 19881121; GB19880027167 19881121, GB19890006643 19890322**Also published as:**WO9006045 (A3)
WO9006045 (A2)
EP0446260 (A3)
EP0446260 (A2)
EP0446260 (A0)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP4501959T

Abstract of corresponding document WO9006045

Monodisperse, superparamagnetic particles carrying a plurality of molecules of an oligonucleotide are disclosed and may be used inter alia for sequencing single stranded nucleic acids. The oligonucleotides may be covalently attached or affinity bonded to the particles either by their 3' or 5' termini. The particles have a specific gravity in the range 1.1 to 1.8 and are 1 to 10 microns in diameter. A kit for the isolation and/or processing of target nucleic acid is also disclosed.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平4-501959

⑬ 公表 平成4年(1992)4月9日

⑭ Int. Cl.⁷ ⑮ 識別記号 ⑯ 庁内整理番号 ⑰ 審査請求 ⑱ 未請求
C 12 N 15/11 Z NA 予備審査請求 有 ⑲ 部門(区分) 1 (1)
C 12 Q 1/44 6807-4B 米 (全 18 頁)

⑳ 発明の名称 核酸プローブ

㉑ 特 願 平2-581005

㉒ 出 願 平1(1989)11月21日

㉓ 願文提出日 平3(1991)5月21日

㉔ 願 出 願 PCT/EP89/01419

㉕ 国際公報番号 WO89/06045

㉖ 国際公報日 平2(1990)6月14日

㉗ 優先権主張 ㉘ 1988年11月21日 ㉙ イギリス(GB) ㉚ 8827157.2

㉛ 1988年11月21日 ㉜ イギリス(GB) ㉝ 8827158.0

㉞ 発 明 者 ホーンズ、エリック

ノルウェー国、エヌー0283 オスロ 2、リルアケロン 9ビー

㉟ 発 明 者 コースネス、ラース

ノルウェー国、エヌー0375 オスロ 3、モノリット・バイエン 12

㊱ 出 願 人 ダイナル・エイ・エス

ノルウェー国、エヌー0212 オスロ 2、スコーエン、ビー・オ

ー・ボックス 158

㊲ 代 理 人 弁理士 山崎 行造 外2名

㊳ 特 定 国 AT(広域特許), AU, DE(広域特許), CH, CH(広域特許), DE(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB, GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

最終頁に続く

① 発 明 の 要 旨

- オリゴヌクレオチド分子を複製型持した、単分散、塩基置換体。
- オリゴヌクレオチドが引-アミノ基を介して粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 粒子がポリアクリル酸又はポリメタクリル酸のコゲーションを有し、オリゴヌクレオチド上の引-アミノ基との反応によって引-アミド基を形成するカルボキシ基を有する、請求の範囲第2項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが引-アミノ基を介して粒子の表面に直接共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、粒子上のアビジン又はストレプトアビジンに結合する引-ビオチニル基によって粒子の表面に結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、粒子表面上のヒドロキシル基に結合する引-ヒドロキシル基によって粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 粒子が1乃至1.1の範囲内である、請求の範囲第1項に記載の粒子のいずれか1項に記載の粒子。
- サイズ範囲が1乃至14クロンである、請求の範囲第1項乃至第7項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが1乃至36塩基の範囲の長さを持つ、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれ

か1項に記載の粒子。

- オリゴヌクレオチドがポリAである、請求の範囲第1項乃至第9項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、塩基塩基のDNA又はRNA配列に特異的に結合する、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、標的塩基の塩の塩基塩基に結合する、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが標的塩基に対しハイブリッド形成する配列並び、粒子に結合した、相関エンドヌクレアーゼ阻害剤を含むリンカー配列を含む、請求の範囲第1項乃至第12項のいずれか1項に記載の粒子。
- 標的塩基を不飽和し、標的塩基を溶液中で請求の範囲第1項乃至第11項のいずれか1項に記載の粒子と接触させ、粒子上のオリゴヌクレオチドを標的塩基上のヌクレオチドに対してハイブリッド形成させる方法。
- 標的塩基がmRNAであり、粒子をその標的塩基に表面に結合させ前記溶液から分離する、請求の範囲第12項に記載の方法。
- 前記粒子上に不飽和した標的塩基に、2つのプライマーのうちの1つとしてオリゴヌクレオチドプローブを使用するポリヌクレオチド塩基塩基による増幅反応を行い、ここで前記オリゴヌクレオチドプローブを標的した粒子がさらに存在しているか又はその複製物として、

特許4-501959 (2)

増幅を可能にするのに十分な量の前記プライマーを与える、増幅の範囲第13項に記載の方法。

17 一置換核酸の配列検査方法であって、

(i) 配列検査するオリゴヌクレオチド (DNA又はRNA) を溶解した低常態単分散性粒子を製造する工程、

(ii) (i) 粒子をいくつかのアリコートに分割し、各々のアリコートに、ポリメラーゼ、置換ヌクレオチドトリホスフェート、及び1つのジデオキシヌクレオチドトリホスフェートを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオチドトリホスフェートは各アリコート面に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの少なくとも1がラベル付けされている工程か又は、

(iii) 全粒子に、ポリメラーゼ、置換ヌクレオチドトリホスフェート、それぞれ異なったラベルを有するいくつかの異なるジデオキシヌクレオチドトリホスフェート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、

を行うことによって、それぞれ異なった長さと特定のジデオキシ塩基をもった鎖を有する、一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、

(iv) ラベル付けされたDNA鎖を溶解させ、大きな量にそれぞれを分離する工程、及び

(v) 配列を決定する工程、を含む方法。

18 核酸塩酸を単離及び/又は増殖するためのキットであって、

(a) 請求の範囲第1項に記載の置換粒子、及び以下に記載の:

(i) ポリメラーゼ

(ii) 逆転写酵素

(iii) 制限エンドヌクレアーゼ

(iv) 適当な緩衝液

(v) ジデオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの

(vi) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの

(vii) オリゴヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの

(viii) 置換的PCRのプライマー及び/又はスーパープライマーであって、ラベル付けされているか又はそのうちの少なくとも1つを含む、キット。

19 請求の範囲第1項に記載の置換粒子の製造方法であって、所望により追加の官能基を有するオリゴヌクレオチドを、粒子の表面上の官能基又は分子に共有又

は種別結合させる、方法。

21 オリゴヌクレオチドを、

(i) オリゴヌクレオチド上のピオチンと粒子上のアビジン又はストレプトアビジンとの反応

(ii) オリゴヌクレオチド上の4'-アミノ基と粒子上のカルボキシル又はトリメチル基との反応

(iii) ヒドロキシル又はプロラクチンとヒドロキシル基を有する粒子上のオリゴヌクレオチドの置換化学的結合

によって結合させる、請求の範囲第1項に記載の方法。

明 細 書

摘 要

本発明は核酸を複製プローブ及びそれらを複製し使用するための方法及びキットに関する。

核酸の自動化的増殖において、特定の増殖物質を配合混合物から分離しこれに非常に低濃度のアコキスを滴することが望ましいことが多い。量的 (titrate) 核酸の十分に長い配列が知られている場合、その配列に選択的にハイブリッド化し、その核酸の固定及び/又は増殖に使用することができるオリゴヌクレオチドを添加することが特に有用であることが判明した。特に、そのようなプローブを不活性化して、増殖反応を含む配合混合物との接触の際に増殖物質が選択的に不活性化され、従って分離されるようにすることが慣習されている。

以前より、オリゴヌクレオチドを置換粒子に結合させることが提案されている [例えば、アドバンスト・マグネティックス (Advanced Magnetic) の米国特許第 4,112,410号、アサコ・コーポレーション (Asaco Corporation) の米国特許第 4,653,110号]。しかしながら、これらは決して単分散ではなく、通常、適当な単分散度まで精製され、その後、オリゴヌクレオチドを含む明瞭の置換粒子の範囲への結合を可能にする官能基をもたず無害で滅菌された懸液にさられていた。さらに、このような置換粒子は特に自動化された反転系では信頼性がなく、実用上好ましくないことが証明されている。

特表平4-501959(3)

DNMの二重鎖部分を介して塩基対子に結合していてもよい。本明細書中で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、合成及び自然のあらゆる長さのDNA及びRNA配列を包含する。

オリゴヌクレオチドの延長は1乃至10塩基(base)が好ましく、1乃至30塩基があるに好ましい。オリゴ(47)配列と、特定の用途では、創薬開発領域(単独又は複合)とを含むブロープオリゴヌクレオチドは、市販のDNA合成装置、例えばアブライド・バイオシステムズ・インク(Ablday Biosystems, Inc.) (U 9444、フォース・ケー・シー・サンカーンセンタータイプ、458-1)製の合成機、のいずれかを利用してすることによって最も好適に製造することができる。

本発明によるプローブは、一般に、核的核種の早期とその後の化学的及び/又は生物学的経路による操作において使用される。

磁性粒子を使用することによる諸つかの利点は明らかに際立っている。磁性粒子は、制的液膜を造り出し、白濁、例えば臨臨工工程に追加され、夜添され、そして従来のリセプタクル (receptor) の一方の側に引き寄せらる。液体はその能不要な成分とともに除去でき、そして、漂白した見込みを有する磁性粒子は和沖海流中に浮散できる。排水工程はつぎのように循環し返すことができる。動的試験を伴う工工程を15分以内で行うことができる。

特に、環状油によって製造された環状重合体はしばしば従来の高沸点に不適切に反応し、かなりの割合が適合した炭状分子とともにススベクション中に捕留し、原料量よりも少ない炭状分子の単離しかけられないことが判明している。本発明は、単分数量常態値 (4402) (3121) (3996) (4114) (4121) 値子が既知に使用された磁気格子よりも大域に清潤性が高いということの確証に基づくものである。

本発明に従って、本発明物は、患者のオリゴヌクレオチドの分子を形成した塩外期超常細胞質を形成する。

凍死予防には、目的一重被褥下に於けるハイブリッド被褥用のグローブとして使用でき、また脚部オリビタレオサドの諸選配を履着を可能にすることにも利用出来る。

オリゴヌクレオチドは一種のDNAであるのが正しいが、それはこれがRNAと一重鎖DNAの両方に対してハイブリッド形成し、かつRNAよりもかなり安定だからである。このようなDNAには、オリゴdT（これは多数真核生物のmRNA上にポリAに転写するポリA）「テール(tail)」とハイブリッド形成する）及び黒のDNA及びssDNA分子中の特定の尾端とハイブリッド形成する特異的のDNA配列が存在し、又は高配列同源性のDNA分子でもよい。をグループは、オリゴdT又は特異的DNA配列でよい一重鎖DNA配列が遺伝子に直接融合したものから成ることが出来るが、

別の利点は、検査核子を用いて行われるハイブリッド形成又はその値のいかなるプロセスも、時間をかけて電子を連続的に検査させ、原子上の物質についてか又は上述核中の物質に結び付いたラベル(label)を分析をすることによって、連続的にモニターすることが容易に出来るという点である。

脂肪の固着を要するにによる種子の分粒は、若果又は保固質を消化せる可能能のある胃腸力を生じる過心升動のような従来のな分解技術よりおける中に歸せらる。

図2 磁子は単分散でありかつ局所磁性であり、これらの特性は、磁子が含まれる反応の過程前に大きく寄与する。磁子に設計されたブローが磁子の反応において溶液中で実質的に定まるで局所状態であるかのように動く反応することは、本報朝の多くべき特徴である。従って、例えば、磁性磁子に使用する超細磁粉の例のMKNの金属磁子を約15分以内に行うことが可能だが、これに代りアフィニティオラム (affinity clays) を使用すると時間である。単分散磁子、磁子、ほぼ同じサイズを有する磁子、を使用することによって、反応速度及びその他のパラメータは特に高いである。磁子磁子磁子（即ち、永久磁性を維持するのに必要な磁区 (fluct) の大きさよりも小さい過磁状態のサブ磁子を含む磁子）を使用することによって、反応中の磁子の溶解 (dissolution of clays) を防ぐことができる。従って、

これもまた局一かつ違いは広範囲を範囲にする。従って、陸軍は密通をかけることによって戦国上に均一な強度で暴風が吹き荒れることができるが、例えば物販の強硬によって、その後の密通局に暴風が降伏させることができる。反逆の暴風は反逆者の均一性は神の自然化への道をもたらし、このこと、江蘇の反逆及び／又は反逆プロセスにおいて右側を多くの中核の必要要素である。最も困難の人間の介入しなくてはならない道徳的機構によって、反逆及び分断が完全な信頼性をもって行えるということは最も困難な事である。

本発明において採用するのに好ましい硫酸塩粒子は、欧州特許第 331010E.5 号（シントフ（Syntof））に従って製造される半分散型硫酸塩粒子であり、この引開の開示は本明細書中に含まれる。これらの粒子中には、酸が特徴的に均一に分布しており、界面に特定の空孔が均一に存在するものがあり、これによって全ての粒子が同じ速度で移動するので、高濃度のある状態、特にオートメーション、を遂行する際に重要である。さらに、種の再現性のある量が各粒子に組み込まれているので、これを、以下で説明する硫酸塩の粒子の位置を可視にする比較的短い波長に露光することができる。従来の、規則性の乏しい生成物においては、小粒子は、選別がな行われた時にブラウン力（Brownian force）を打ち消すには少なすぎる張しか含まれていないか、是れは全ての粒子の位置より大きな反作用を置きにくい状態を生じさせる。従つての自動化さ

特許第4-501959(4)

れた装置は、粒子を反の極端内に保持し、一方極端は流れていかせるのに、電極を使用している。この様な装置で使用するためには、荷電粒子の均一な磁場の及び絶縁的性質は必須のものである。

本明細書中に於いて使用される「単分散」という用語は、5%未満の重量標準偏差を有するサイズ分布を意味するものである。

1.1乃至1.5の比を有する粒子を使用するのが好ましく、1.1乃至1.5の比が特に好ましい。本発明に於いて使用される単分散粒子において、比重はこでも特に均一であり、均一で予測可能な速度での移動をもたらす。

単分散粒子は、少なくとも1ミクロン、好ましくは少なくとも2ミクロンの直径の球状粒子であるのが望ましい。10ミクロン以下、好ましくは5ミクロン以下、例えば約3ミクロンの直径であるのが好ましい。粒子が小さくしなければなるほど沈降はゆっくりになり、沈降時間が反応時間に匹敵するほど長くなることもあり、従って装置の効率の必要性を有する。しかしながら、従来技術で使用されているような、ずっと小さい直径の球形粒子を含む平均直径が1.1乃至1.5ミクロンの粒子は、電化への応答において信頼性があるようには見えない。

グロブの粒子への結合は、直接の化学結合並びにストレープアビジン (streptavidin) / ビオチン (biotin) 結合などによる間接的結合でよい。

細孔を有した表面に荷電の官能基を導入するためには、例のモノマーを細孔中及び表面で重合させる。好ましい種類の粒子の場合、表面は、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 基を有してポリマー基に結合している官能基を有する。その物の好ましい粒子は、メタクリル酸の重合によって得られた官能基を有する。

従って、例えば、粒子中に初めて存在しているHCl基を、米国特許第4512417号に記載されているようにジエポキシドと反応させ、その後メタクリル酸と反応させて単分散性重合体を得てもよい。メタクリル酸との反応は、以下で示されるHCl粒子のような、水溶性カルボキシル基を有するポリマー重合体を得る。同様に、HCl、HBr、及びHNO₃のようなジエポキシドとの反応の上記官能基をジアミンと反応させることによってアミノ基を導入することができ、一方HCl及びHBrのような、アミノグリセロールのようなヒドロキシルアミンとの反応はヒドロキシル基を導入する。

ダイナビーズ (Dynabeads) M45 (直径 5.5ミクロン) (これはノルウェー、オスロのダイナビーズ社から得られる) は、単分散性エポキシドで被覆されており、エポキシ基とヒドロキシル基の重合体をもたらす。しかしながら、水との接触でエポキシ基をヒドロキシル基に転換する。

ダイナビーズ M45 (直径 3.5ミクロン) は、ストレープアビジン (streptavidin) との反応によってヒドロキシル基を有

グロブの結合用に、荷電粒子は、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、又はアミノ基を呈現してもよい。一般に、これらは、被覆されていない単分散性荷電粒子を処理して、上述の官能基のうちの一つを有するポリマーの既知基を施すことによって得られ、ポリマーの例は、ヒドロキシル基を導入するためのポリグリコールをともなうポリグリセリン、ヒドロキシル基を導入するためのセルロース誘導体、カルボキシル基を導入するためのアクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマー、アミノ基を導入するためのアミノアルキルポリマーなどである。米国特許第4512417号は、このような表面被覆をたくさん紹介している。

本発明において使用するのに好ましい数値された粒子は、米国特許第4512417号、第4512418号、並びに第4512419号に於いて粒子の性質によって製造され、これらの引開の開示は本明細書中に含まれる。従って、例えば、スチレン-ジビニルベンゼンから製造され、1.15ミクロンの直径を有するマクロ球状 (macro-spherical) 多孔質高分子粒子は、HClで処理され細孔の表面にHCl基が導入された。その後、粒子は、H₂Oの水溶液中に分散された。H₂OはHCl基によって酸化され、これは細孔の内側に不溶性の酸素をシームロキシ化化合物を析出させる。同様に、単に、酸化還元剤の選択的競争として、細孔粒子表面にわたって存在する。H₂O基はH₂Oとの反応によってH₂O基で還元される。

するポリスチレンビーズである。

上記のタイプの官能化された表面を使用することによって、DNA及び/又はRNAの検出の場合が非常に低くなり、特に、カルボキシル化ビーズの場合にそうであることを本発明者らは発見した。

ハイブリッド形成したDNAを次にcDNA合成に適用する場合、グロブと23リンカーはカルボキシル基を介して荷電粒子に結合しているのが好ましく、このDNAは同時に5'-末端アミノ基が露出され、これはカルボキシミッドカップリング剤を使用してカルボキシルとアミド結合を形成させることができる。DNAの3'-結合は、5'-アミノDNAと反応するようにH₂Oで処理されたヒドロキシル官能基粒子を処理して行うことである。

ポリゴスグレオチ (PDNA) の3'-結合もまた化学的結合によって行うことができる。ここでもまた単分散性粒子の非常に均一な性質は、ジーン・アセンブラー (Gene Assembler) [ファーマシア (Pharmacia) 社] のような自動化された合成装置中での合成に特に適する均一な反応環境をもたらす。荷電粒子は、始めにヒドロキシル基又はプロナトキシルヒドロキシル基を被覆されることを要する。ダイナビーズ M45 のダイナビーズ M45 はこの目的によく適合する。しかしながら、必要な場合には、カルボキシルのようなその他の官能基を使用してヒドロキシル基を有するリンカー又は3'-結合基を

特表予4-501959(5)

レオチドを結合させることができる。

①・結合は、①・アミノノカグロタレオチドのトリル基の活性化粒子へのカップリングによって行ってもよい。トリル基の活性化粒子は、ダイナミックのダイナミクスに類似したようなヒドロキシル基の活性化粒子をトリル化することによって製造できる。トリル基の置換は、活性化粒子に直接結合した①・アミノ基を要する。

しかしながら、プローブがDNAの塩基にのみ反応する場合、プローブの①・基が活性化粒子に結合してもよく、これは、DNAの①・ホスフェート基と粒子上のアミノ基の間にホスホアミデート結合を形成させることによって可能に行うことができる。

ビオチンラベルされたタレオチドは市販されているので、DNA断片の①・末端はDNAポリメラーゼを使用して断片にラベル付けでき、これらは、例えばヒドロキシル基を介して活性化粒子に結合しているアビジン又はストレプトアビジンに簡単に結合できる。ビオチンラベルは、1つ以上の①・アミノカブロン部分のような。スベーターーム(1961, 1972)によって、タレオチドに結合させて互換性を最小化できる。従って、例えば、二重鎖プラスミドが制限酵素で切断され、特定の①・末端にビオチンを付与するように、その末端にビオチン化されたタレオチドを付与することができる。細分化された(1961, 1972)プラスミドが、その後、別の制限酵素で切断される場合、二重鎖DNAの断片は切断され、ストレ

プトアビジンに結合されたビーズに結合する可能性がある。ビオチン化されていない断片を除去するとビーズに結合した、ビオチンの結合したタレオチドが得られる。

一般に、塩基を置換化し、その後のプローブを結合させるのが有利であり、活性化粒子は10¹⁰ ~ 10¹² のプローブを有する。(1 ~ 100 ng/ml)。活性化粒子の均一なサイズは、プローブが粒子と反応する距離をプローブ密度を調整する点で有利である。均一なプローブ密度は、全てのプローブが、それらが使用される特定の点において実質的に同じようにふるまうことを確実にする点で重要である。

陽電活性が、粒子の表面に非常に近いところ、例えばアベス(1966)と同様、で起こるようであることは、本発明の顕著な特徴である。従って、もし制限酵素が浸透するようなら、配列中に存在し、かつプローブがその鎖プライマーとして使用される場合、10¹⁰ DNAと比べて10¹² DNAを、DNAポリメラーゼによって制限酵素を結合して粒子表面に向かって合成でき、従って、それを適当なエンドヌクレアーゼによって断片に切断できることが判明した。本発明のカルボキシル化された粒子の場合、粒子のミクロ表面が非常に不規則であり、ハイブリッド形成とその表面近くの陽電活性に対する立体障害を軽減できるような非常に大きな表面積を存在させていることが判明した。一方、このようなカルボキシル化された粒子への非特異的結合は増加しない。

本発明による、オリゴタレオチドを保持している陽電活性単分散粒子は、応用面において使用できる。これらのいくつかを以下に説明する。

1. mRNAを含む混合物からのmRNAの分離

真核細胞エキスからmRNAを分離する従来の方法は、ティ・ロニアチス(T. Riazis) 等によって報告されている(モルヤム・クロニグ(Morley & Cronin); リポソーム・マニピュレーション(Liposome Manipulation); 1971 ~ 1972)。簡単に述べると、ポリデオキシリブロン(オリゴIT)を、親和性マトリックス、典型的にはカラム、を作るのに使用されるアグロースビーズ又はセルロースに結合させる。細胞エキスをカラムに通し、細胞エキスがカラムを通過するにつれて、mRNAのポリアデニレート尾(121)がビーズ上に不動化されたオリゴITに結合する。カラム洗脱し、その後mRNAをカラムから洗脱させる。しかしながら、通常少なくとも長時間というそれに必要な時間のために、この方法は煩雑からはなとない。

RNAの全ての種は、細胞液相中に存在するリボヌクレアーゼによって迅速に加水分解する傾向にあるので、細胞の溶解後できるだけ速やかに凍結し、cDNAに逆転写することが重要である。そうしないと、mRNAのみならずの割合が劣化し、完全な遺伝子のDNAに反応する遺伝子のmRNAの量を定めたの

が困難になる。細胞エキスからmRNAを分離する従来の方法を使用すると、mRNAがカラム上にいる間に多くの時間が費やされ、望ましくない劣化をもたらす。さらに、アグロース又はセルロースのカラムは汚染され、既にあるにその他の細胞成分によって詰まり、容易に再使用できない。

本発明の目的は、mRNAを容易に分離する迅速な方法を提供することである。

本発明の別の特徴によれば、RNAをその他の成分とともに含有する液体からRNAを分離する方法であって、

- (i) 結合したオリゴタレオチドプローブを有する親和性の陽電活性単分散粒子を細胞液相に添加し、それによってRNAを親和性プローブに付しハイブリッド形成させて細胞粒子に結合させる工程、
- (ii) 細胞粒子を固体表面上に物理的に固定させる工程、及び
- (iii) 液体とその他の成分を固定した粒子から分離する工程、

を含む方法が提供される。

望ましくないRNAのランダムなハイブリッド形成を防ぎ、ハイブリッド化反応の局所的な成分の効果を完全にするために、陰性粒子は最初の陽電的吸引の僅少くとも1回洗脱するのが好ましい。ランダムな部分相同によって結合されたRNAを除去するために、こ

特表平4-501959(8)

の秩序はストリンジェント (stringent) 条件下で、固相を上げさせるか又はハイブリッド化中に使用するものよりも強い相温度、例えば 0.1 M の塩化ナトリウム又は懸濁液 (aqueous solution)、を使用することによって得られてよい。

ストリンジション(stringing)は通常ブローブの長さとも含有率によって計算される。ブローブオリゴメタレオキドと標榜の異なるAの層の相関(hetero)が不正確である場合、洗淨は比較的少量のストリンジント条件下で行うべきである。一般に、洗淨は、2重(hetero)と標榜(hetero)より12℃低い温度で行われる。A層の下の、と標榜のアニオンの文庫の 180 - 190℃ からの以下の温度に達して層を交換する。

$$(c) \quad T_H = 89.1 \pm 0.41 \quad (G \div C)M = 850/4$$

しはヌクレオチド中のグロースの平均長さに等しい。

(4) この2国D.N.A.の法は、誤って組み合わされた塩基対の数が1%増減するごとに1度下がる。

$$\{c\} \quad (T_n)_{n \geq 1} \quad \sim \quad (T_n)_{n \geq 1} \quad \sim \quad 10.5 \log_{10} n_{\text{eff}} / n_{\text{eff}}$$

ここで、 μ 、及び μ_0 は2つの相のイオン強度である。

小さいオリゴアクリル酸に対しては、この反応は
以下のようにしての程度で進行する。

$$T_m = 2 \times (\text{A}+\text{T 残基の数}) + 4 \times (\text{G}+\text{C 残基の数})$$

ハイブリッド化反応は、とくに塩化ナトリウム溶液又は水媒精分野で公知の前置段階で行うのが好ましい。

[「タコレイタカ・アシッド・ハイブリダイゼーション (Marine Acid Hybridization)、ゼー・ディル・ヘイムズ (Zee Huis) 及びユス・ジュー・ヒガンズ (U.S. Higanzu)、アイアールエル・プレス (I.R. Press)、1983、を参照のこと)。

ブライブからの川R.N.A.の除去は、単純な懸濁液、例えば、1:1000、中において5℃で無菌操作することによって行うことができる。

本実験の方法は、特定のmRNA分子の分離の前の予備精製工程としてのように、細胞抽出液からの全てのmRNA物質の分離に適用することができる。この目的のために、プローブはオリゴ(dT)、即ち、例えば12塩基3'末端塩基(3'-poly(A))、即ち、15乃至30塩基のような、比較的小さいデオキシチミジン単位の数、であるのが好ましい。このような類は、デオキシチミジンの酵素阻害を含いては、より短い鎖に対しては、磷酸化されたDNA合成又は従来の重合によって、容易にかつ安価に製造することができる。

オリブ-IT は共役又は兼用割合によって粒子に直接
的に結合できる。この場合、ハイブリッド化された
油又は水はその後加無によって溶液中に溶解し、所望
の濃度溶液中所望の濃度の調整の油又は水の割合物を与え
る。

この実存意味の特別の側面は、もしそれが δ -束縛

を介して塩子に結合する場合、DNAプローブの3'末端はまた逆転写用のプライマーとして作用して一段階増幅的 (semiconservative) DNA (sscDNA) を形成することが可能であり、sscDNAそのものの量、長さにより、本願出願人の特許特許公報第 183152.1号及び第 183153.1号に対応する本態と同一付けの図表出願 (その内容は参考として本明細書中に図入られる) に従って、単純したsscDNAに制限的の二重鎖cDNA (dscDNA) を製造するのに使用できる。1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ様性を有するリンカーを介してのsscDNAプローブの3'末端の結合によって、このプローブ、合成されたdscDNAは、順逆転写所切斷によって塩子から意味を失うことができ、塩子は厳格に分離される。

しかしながら、本発明の別の実施態様によれば、ブローブは選別的に R_2D 分子に対して特異的である。

細胞因子にカップリングされた特異的のDNAプローブの使用は、プローブとハイブリッド形成する共通の配列を有するmRNA分子の存在(cells)を単離する際に特に価値がある。従って、例えば、免疫グロブリンに対するmRNAのコーディングは、強い弱と強い親の一定の範囲からのDNAプローブを使用して解題する簡便なシステムから推定できる。連続的に分析する既知の研究において、産生子の保固された配列(coding sequence)に対してするプローブを使用して一過の免疫

おれた達は平かな顔でまいた血をRにAを破壊すること
ができる。

2. 一重鎖DNAの電解

水相中による逆性オリゴヌクレオチドは、 $mRNA$ の場合と実質的に同じ方法で、 $sRNA$ を分離するのに使用される。知能能放のように、 DNA がサンプル中に二重鎖の形態で存在する場合、部分変性工程が知能に必要である。これについては、後述の項において無活性の発明でも説明する。

ポリ BT ブローンを担持する本院附の遊走粒子は、特定の順的積層配列 (specific layer sequence) の分離に有利に使用することができる。集積積層及びさらに、例えば、 10^{-15} 以上ユニットのポリ BT チームの位相的配列に特異的な BT 配列を含むブローンを合成できる。ブローンは積層面とハイブリッド形成し、そしてナノレベル付けられたブローンは液相の均一の配列とハイブリッド形成する。そのため、この三元複合体を調製するためにポリ BT を担持している遊走粒子を使用でき、前掲書外は、ポリ BT とポリ BT の間の水素結合のみが生じるようなものである。ポリ BT とポリ BT の間の比較的確い結合は、例えば、近接又はグアニンシチオシンネート陰置則による変性によっても、容易に可能になる。従って、ハイブリッド化液相からの遊走粒子の除去及び沈降の後、三元複合体を粒子から遊離させることができ、さらに遊離後

発表号4-501859 (7)

に複製する大抵は、1面以上のマイクロの複製品を用いることができる。この複製は、通常のラベルでラベル付けされた複製品の形成、複製的分派システムにおける「ノイズ(noise)」の除去の際、を防ぐ点で特に有効である。

6. 一般のRNAはDNAの塩基配列決定

DNAの塩基配列決定には2つの主要な方法、即ち、Maxam-Gilbert法とSanger法がある。Maxam-Gilbert法は、1本の短いDNA断片でラベル付けされているDNAを用いて行われる。ラベル付けされたDNAは、その後、4つのメタクロシアドの1つで塩基的に切断される。断片は、平均して約1本あたり1つの切断が起こるように選択される。与えられた塩基での切断の位置の混合物中において、各々の切断された断片は、末端からその塩基の位置の1つまで伸びる塩基性断片を生成し、そのような断片は塩基の全ての位置に対して進む。これらの断片は、例えば、2-(4-アミノ-2-メチル-5-フェニル-1,3,4-オキサジリジン-5-イル)イソチアジン-3-オンによって分離される。切断された塩基までの距離を測定することによって、全体の配列を決定する。Maxam-Gilbert法は100塩基以上の配列を決定するのに使用できる。

DNAの塩基配列決定用の13341ジデオキシ法は、断片的複製の制御された複製に依存する。DNAポリメラーゼは一般にDNAの特定配列のコピーに使用され

る。この場合、複製の断片によってプライムされる(primed)。4種のデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートに加えて、阻害(inhibition)混合物は、それらのうちの1つ、3'-ジデオキシ阻害物(salt)を含む。このジデオキシ阻害物又はデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートのうちのいずれか1つがラベル付けされる。この阻害物は次のホスホジエステル結合を形成するために必要な3'-ヒドロキシル基を欠いているので、この阻害物の組み込みは新しい断片の成長を阻止する。従って、ジデオキシ阻害物がDNA断片にある特定の位置の断片が形成される。このような断片形成-停止(hybridization)断片の4つの断片(各々のジデオキシ阻害物に対して1つずつ)をゲル上で電気泳動させて、4つのレーン(オートラジオグラムからDNAの塩基配列を読む。最近、ジデオキシ法の改良が発表され、これは塩基性阻害物のオリゴヌクレオチドプライマー、即ち、4つの塩基停止阻害物の混合物の中で別々に着色されたもの、への結合を含む。これらの混合物は混合して、一層に電気泳動させる。それらが検出器を通過するとき、それらの蛍光によって、DNAの分離したバンドが検出される。この方法では100塩基までの配列を決定することができるが、一般に、約150塩基のようなより短い配列が好ましい。

DNAのかなり長い配列は、この方法によって塩基

配列の決定をする前に、より小さい断片(150 - 350塩基)に切断しなければならない。通常、配列データを正確に得るためには、断片的に異なる断片が必要である。断片的に異なる断片の形成はDNA配列の決定におけるもう一つの工程を作り出す。

通常使用される塩基配列決定法の1つは、DNA配列クローニング法で形成するが、これは一般にDNA鎖を与える。配列が100塩基よりも長い場合、通常の方法は、断片的な塩基配列を決定し、このようにして得られた情報を使用して、次の100塩基部分のプライマーを合成し、そしてこの手順をDNA鎖全体の塩基配列が決定されるまで繰り返す。しかしながら、テンプレートDNAを基盤としてのDNA複製がゲル上に導入されなければならないので、各断片はクローニング法での新しいサンプルを使用する必要がある。断片的な塩基配列決定法に対する要約がある。また、簡単、迅速、かつ自動化につながるような方法に対する要約もある。

本発明のさらに別の面によれば、一般に塩基配列決定方法であって、

- (a) 配列決定すべきオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を複製する塩基配列決定法を特徴する工程、
- (b) (a) は手を4つのアリコートに分割し、各々のア

リコートに、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、及び1つのジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオシドトリホスフェートは各アリコート毎に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの少なくとも1つがラベル付けされている工程又は、

(c) 各アリコートに、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、それぞれ異なるラベルを有する1つの異なるジデオキシヌクレオシドトリホスフェート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、

を行うことによって、それぞれ異なる断片と特定のジデオキシ塩基をもった断片を生成する、

一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、

(d) ラベル付けされたDNA鎖を分離する工程、及び

(e) 配列を決定する工程、を含む方法が提供される。

配列決定される塩基配列決定法はオリゴヌクレオチドであること、及び工程(a)が本発明による場合とされたオリゴヌクレオチドを有する塩基配列決定法を含むことに注目すべきである。配列決定される塩基配列決定法はDNAである場合は、ポリメラーゼは

特表平4-501959 (B)

DNAポリメラーゼでよく、RNAである場合は、ポリメラーゼはDNAポリメラーゼまたは逆転写酵素であることが認められるであろう。

サイズ分別時に断片の同定を容易にするために、プライマー配列は、それに適合したラベルを有してもよく、あるいはデオキシトリホスフェート又はリボキシホスホは、例えば、置換基でラベル付けられてもよい。細胞核中に結合したテンプレート鎖とDNA断片の両方を塩基配子とともに前向きに電気的に分離し、cDNA断片を配列決定装置中に導入させることによって、通常のラベルを基から分離できることは、本発明の配列決定法の利点の1つである。従来の配列決定方法においては、通常はラベルが配列決定ゲルからの後(1978)を除去していた。

本発明による特に好ましい方法の1つは、最初に、配列決定するDNAのクローニングベクター中で増殖させて配列決定用のDNAを十分な量準備する。あらゆる種類のクローニングベクターを使用できる。その後、DNAはベクター中の適当な18塩位で切断され、鎖はベクターの短鎖部分(これは既に配列決定されている)を離して塩基配子への結合に適する点を選択する。

二重鎖DNA配列が3'-デオキシニル化剤を介して塩基に結合している場合、それを寛容させて、配列決

定するDNAを含む、酵素プライマー結合を介して塩基配子に結合している一塩基を脱すことができる。

上記のものに対して相補的なプライマーはアヌール(1984)でき、例えば、放射能アクリルアミド及びポリマー化プライマー部分を加えてアヌーリングすることによってラベル付けできる。その後、上で塩基を述べたような、サイズ分別を含む配列決定が行われる。配列決定は、通常、わずかに15%の塩基に対して検出られ、正確なサイズ分別を可能にする。これは、リボキシアクリルアミドのノーマルアクリルアミドに対する比率を調節することによって達成される。合成されたcDNA断片は、数上のDNAに害を与えることなく強く酸性によって除去できる。その後、配列情報は、配列決定されるべき次の一連の塩基の短鎖プライマーを設計するために利用できる。このようにして、非常に長いDNA鎖(例えば、3100塩基)が、部分局に、従来の方法に見られる重複の問題に遭遇することなく、迅速配列決定できる。

クローニングベクターに組み入れられているプライマー配列は、簡便には、従来の11塩基配列決定において使用されている、いわゆる、「ユニバーサルプライマー(5501111 511005)」である。134'鎖断片を有する全てのベクターはこのプライマーを有しており、これは、5'-GTATTCACGGCCGTA'の配列を有している。本発明の迅速配列決定法に種々の利便を齎ること

ができる。

A. 配列決定されるDNA鎖は、3'-デオキシニル化され、ストレプトアビジンを含む塩基配子に結合してもよい。所望により、二重鎖DNAをこのようにして結合させ、その後、塩基して配列決定に必要な一塩基を与えてもよい。これは、上遊塩から分離されるべき分離した鎖が不活化された鎖で汚染されないようにでき、このもう一つの鎖は明確に配列決定して配列情報の確信を与えることができることは注目すべきである。プライマーはDNAの3'鎖端、あるいは、上述のデオキシ及びリボキシ鎖端に約300塩基までのハイブリッド形成し、次の部分を配列決定するために上述したようにさらにプライマーが必要とされる。

B. 配列決定されるべきDNA鎖は、塩基配子に短接されているリンカーにハイブリッド形成でき、このリンカーは一重鎖DNAのループの形態であり、ここで、3'末端が3'-末端に近い領域でハイブリッド形成し、DNA鎖の3'末端領域に対応する塩基配子(111111)を産す。このようなループは、アミノ又はヒオキシン基を介して塩基配子に結合することができ、これらの基は配子に短接されたカルボキシル又はストレプトアビジン基とそれと反応することである。DNA鎖は、3'-末端で脱オスホリル化され、その後、ループの3'-末端に配位して両鎖間

合を与えるともよい。ループによって与えられるものに対応する塩基性塩基を有する二重鎖DNAは、このようにして結合することができ、2つめの鎖はその後遊法によって除去でき、311塩基までの第1の部分の配列決定するためのプライマーとしてのループの3'-末端を脱すことができる。

C. 塩基配子、DNAのある部分に対しハイブリッド形成するプローブを短接することができ、このプローブは第1部分の配列決定をするためのプライマーとして役立つ。プローブに対してハイブリッド形成するDNA配列は、配列決定されるDNAに対して3'-であるのが好ましい。これに、後者のDNAが追加の塩基DNA配列とともにベクターから切断される場合、迅速に起こり得ることである。核酸がmRNAの場合、プローブは、塩基塩基mRNAのポリヌクレオチド(111)に対しハイブリッド形成する3'-末端オラゴ・AT配列でよい。或いは、例えば、mRNAの3'-末端配列が既に知られている場合、プローブは、mRNA中のある配列に対しハイブリッド形成する特異的DNA配列でもよい。

配列決定塩がプライマーにラベルを短接することを要求する場合、プライマーとして短接するプローブは、合成されたDNA鎖をラベルとともに配子から切り取けるように、適当な18塩位を有していなければならぬ。この要求は方法2)及び3)の

特表平4-501959 (9)

両方に適用される。しかしながら、グロブに両端結合させて合成されたDNA鎖とともに容易に分離する、分離可能なプライマーを単に適用することでもできる。

4. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による鎖の増幅
鎖的DNA分子は、熱変性後又はその他の原料中に極めて少量でしか存在しないことが多く、配列決定の前にそのようなDNAを適切に増幅(amplify)するために、ポリマー連鎖反応(PCR)法を使用してもよい。鎖的DNAを増幅させるためにはタコウエンゲ工程を使用するよりもむしろPCR法が採用される。PCR法においては、鎖的DNAの公知の配列に特異的な一対の塩基プライマーが選択され、ポリメラーゼの存在下に、各プライマーが鎖的DNAテンプレートの全長まで伸びるDNA配列を生成するように、一方はコーディング鎖の3'末端又はその付近ハイブリッド形成し、他方は非コーディング鎖の3'末端又はその付近でハイブリッド形成する。このようにして形成されたDNAがその鎖、鎖鎖には鎖鎖での増幅による、断片化原因によるものを含む、新たに形成した一連鎖DNA配列は混合液中に存在する遊離のプライマーに対しハイブリッド形成し、通常アニーリングに達する範囲まで温度を下げた後、ポリメラーゼの存在下にさらにDNA鎖が合成されるが、今度は2つのプライマーの両端間しか伸びない。ポリメラーゼは、断片間

工場で使用される高温中で生き延びることができるのが好ましく、超する特異性ポリメラーゼ、すなわち、Fig. 1が最近利用できるようになった。遊離の2つのプライマー及びDNA合成に必要な遊離のヌクレオチドが溶液中で維持される場合、別々の鎖が合成され、分離され、プライマーまでアニーリングされ、新しい鎖が合成され、これらがただ単に上記の工程に対する最適化の際で温度を上下させることによって行われる、既知塩基アクセスを行うことができる。この方法においては、オリジナル鎖的DNAの増幅が断片間鎖であり、断片の数百万倍の増幅が比較的短い時間で行うことができることが判明した。

しかしながら、プライマーおの他のDNAへの非特異的結合と、それにより鎖的DNAに加えその他のDNAが増幅されることによって、この方法は必ずしも十分に選択的ではない。プライマーの非特異的結合による、このサンプルDNAのランダムな鎖位の増幅は、鎖的DNAからのシグナルに比較してバックグラウンドのノイズを増加させる。多くの場合、このバックグラウンドノイズのレベルの増大は、この方法の有用性に大きく影響を与える。

分子タコウエンゲに関連して、このプライマーの特異的結合の問題が、第1の対のプライマー中に入れて予になっている第2の対のプライマーを使用することによって解決できると提案されている。

4つの鎖的プライマー化を要求することによって非特異的結合の大幅な低減化が達成される【ホリス、ゲー・ビー(Hillis, B.M.), ケー・ワローナ、エフ・ユー(E. Fritts, P.J.), ノンゲ・イン・エンゲイモロジ(J. Methods in Biochemistry) (1983) 133-200頁、及びライシュニク、エル・ユー(Erichson, L.A.)、カウ・ゼルド・ボ、(1984) 11-529-542頁、を参照)。エンゲルケ、ディー・アール(Engelke, D.)らは、オリジナルのプライマーの一方に入れ子になっている、1つの新しいプライマーのみが、鎖的DNAのより大きくかつより一貫した増幅をもたらすことができることを示している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:541-545頁)。

本発明者は、本発明の結合したオリゴヌクレオチドを有する鎖的分子がPCR増幅法におけるプライマーの1つとして使用できることを発見した。この反応の増幅は増幅中で見られるものに近い。入れ子になった第2のプライマーが使用される場合、本発明の分子は第2のPCR反応において使用することのみが要求される。各々の場合、増幅された全てのDNAは鎖鎖態に不動態化され、増幅の反応を促進するために容易に消化できる。増幅されたDNAが最終に除去できるように、分子とオリゴヌクレオチドプローブ/プライマーの間に対応又はその他の可逆的結合を設けるのが好ましい。

デオキシリボース/プライマーを使用するPCRを行うこともでき、また鎖的DNAを増幅するためにアビタン又はヌクレオチドアビタンで被覆された本発明の鎖的分子を使用することもできる。

4. 鎖的DNAのラベル付けとその分析

英國特許出願第 1127166, 1号に対応する本願と同日付けの本願出願による国際特許出願であって、その内容が参考として本明細書中に組み入れられているもの、には、鎖的鎖にラベル付けする方法であって、鎖的鎖の公知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを結合した鎖的分子を鎖的鎖を含む混合物に溶解し、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び遊離な塩基とともに使用して多数のラベル付けされたヌクレオチド塩基を組み入れたDNAを合成する方法が記載されている。この方法は特に簡便で迅速であり、鎖的鎖を定量的又は定性的に分析するのに使用できる。

5. cDNAの合成

英國特許出願第 1127166, 1号及び第 1127166, 2号に対応する本願と同日付けの本願出願による国際特許出願であって、その内容が参考として本明細書中に組み入れられているもの、には、オリゴヌクレオチドプローブを結合した鎖的分子を鎖的鎖に知してハイブリッド化し、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び遊離なヌクレオチド塩基とともに使用して、

特表平4-501859 (10)

- cDNA鎖を合成させることによる、cDNAの合成が促進されている。この方法は、個々のcDNA分子を合成するため、又は存在する特定量の核酸の全て、例えばRNA中の全て、に対応するcDNAを製造するために使用できる。
6. 本発明の遺伝因子を使用する方法のためのキット
- 本発明はまた本発明の方法を実施するためのキットを提供する。
- A. サンプル中の全てのmRNAを転写するためのキット
- (a) オリゴ-dT を担持した本発明による遺伝因子及び1つ以上の
- (b) ハイブリッド化緩衝液
- (c) 洗浄用緩衝液
- B. サンプルから特定のmRNA又はss-cDNAを単離するためのキット
- (a) 特定のオリゴヌクレオチドを担持した本発明による遺伝因子及び1つ以上の
- (b) ハイブリッド化緩衝液
- (c) 洗浄用緩衝液
- C. DNA又はRNA転写阻害剤施用のキット
- (a) オリゴ-dT又は特定のオリゴヌクレオチドを担持した本発明による遺伝因子
- (b) ポリメラーゼ及び1つ以上の
- (c) 適当な緩衝液

- (d) リデオキシヌクレオチド (dT、dG、dC、及びdA)
- (e) デオキシヌクレオチド dT、dG、dC、及びdA
- (f) リデオキシヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、又はオリゴヌクレオチドであって、各々ラベルを担持しているか又は指示するように適合されているもの。
- D. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用キット
- (a) 遺伝物質の1'末端用の特異的プライマーDNAプローブ/プライマーを担持した本発明による遺伝因子；
- (b) 所望によりラベル付与された標準的PCRプライマー；
- (c) 局安定性ポリメラーゼ；及び1つ以上の
- (d) 適当な緩衝液；及び
- (e) 熱安定性DNAポリメラーゼ。

以下の実施例は説明のためのみに与えられている。

実施例 1 (a)

カルボクシミド(201)で修飾された5'-Hxプローブのカルボキシル基への結合

- (a) プローブのカルボキシル基への結合に使用される反応は以下の通りである。チュウ(Che) 5によって記載された [Che, 3, 1, 1, 及びオーゲル 1991, 1, 1, (1995) 384-387, 387-391]、1.5%硫酸銅を酸化したプローブの5'末端に導入されたアミノ基は、塩基

のアミノ基特性と比較して、アルキルリンカーの末端第1アミノ基のより大きな反応性をもたらす。従って、核子上のカルボキシル基はこれらの第1アミノ基と優先的に反応することが予想された。

2500カルボキシル核子100当たり、0.1 M イミダゾール緩衝液(pH 7, 0.1 M NaCl) の100 µl 中の150 µl 5'-Hx改質プローブを添加した。反応混合物を穏やかに撹拌しながら室温で24時間孵った。

- (b) Hx改質プローブをアプライド・バイオシステム・レンササイザー (Applied Biosystem Synchronizer) とアミノリンク (Aminolink) E を使用して製造した。カップリング反応は以下の通りであった。

2500カルボキシル核子100当たり、0.1 M イミダゾール緩衝液(pH 7) の100 µl 中の150 µl 5'-Hx改質プローブ、0.1 M NaCl を添加した。反応混合物をローラースキナー [コールター (Coulter)] 上、室温で24時間孵し、その後、0.1 M NaCl (45) を含むTE緩衝液中で洗浄した。

ハイブリッド形成 (ハイブリダイゼーション) 段階 1

様々な量の結合したプローブを有するある範囲の核子を種々の2500オリゴdTPローブを用いてハイブリッド形成実験において試験した。

核子は、核子100当たり1 ~ 300 pool の結合したプローブをカバーしていた。

2500オリゴdオリゴヌクレオチドの量を徐々に増加

させたが、徐々に増加する量の結合したプローブとハイブリッド形成させた。100 pool が、結合した250 poolを有する核子に対してハイブリッド形成した。しかしながら、鎖状分子が1000) の範囲にあった場合 [鎖状分子 R100、プロメガ・コーポレーション (Promega Tech. services)]、結合したプローブを100 pool 有する核子より密度が高くカップリングした核子とを比較してもハイブリッド形成効率に相違はなかった。

実施例 2

カルボクシミド(106)で修飾された5'-Hxスフェートープローブのアミノ核子への結合

ゴークェらによって記載された方法 [ゴークェ、エス・エス (Gosk, 3, 1, 1) 及びルッゾ、ジーン・エフ (Gosk, 6, 1, 1) (1993) 384, 384-391, 391-392] によって、プローブをホスカルアミデート結合を介して3種の異なるアミノ核子に結合させた。これらの異なる核子に結合したDNAの量は、1.1 ~ 11.1 マイクログラム/0.1であった。

オリゴヌクレオチドリンカー (5核子) の末端にアミノ基を担持する2400核子は、より短いリンカー (3核子) 上にアミノ基を担持する2400核子よりも多数のプローブと結合する。2400核子のようにリンカーを短くすると (原子の数 30)、核子に結合するプローブの量の減少が観察される。これはおそらくリンカーの二次構造によるものであり、これが末端アミノ基をキャプ

附表平4-50195# (11)

D-III プローブのトシル誘導体に対するカップリング

アブライド、バイオシステム・DPAリンセタイザー III とアミノリング II を使用して、新しい高エネルギークロマトグラフィー装置を導入し、実験室に第 1 期。高エネルギー人した。アミノリング II はアブライド、バイオシステム社から供給された。合成後これらのアミノ環状ポリマークロマトグラフィー装置に使用された。

トシル亜塩化水素の電子は、オスロのダイナール(Dynal)社から提供されている。

キャブリング手順:

10 mg のトリル態花種子を、100 μl の 0.5 M H_2NBF_4 中 10 μl に 3% 炭素オリゴアセチレンと混合し、ローレーミキサー（コールター）上で 70°C で 10 時間攪拌し、その後 0.1 M HCl (4x) を含むリソソーム液中で洗浄した。

实例 1

連聲念破

ダイナビーズ R111 磁子を使用した。これは、直径が 1.1 ミリメートルで厚さ 0.13 ミリメートルであり、 ± 200 磁子を隔ちてあり、 ± 200 磁子と距離が真空中に第 1-0H 磁気を含んでいる。

合成基 (ファーマシア・グリーン・アセンブラー (Pharmacia Green Assembler)) を使用して、D 株 A の増殖を濃度別に測定された。

3. 13.5 クロンの粒子に適合させるために種々まい変換が必要であった。アブライド、バイオシス、チム社からの

リングに鞆同で巻なく下るやでもあらう。

同時同時に結合したDNAの量は、おそらく単位細胞あたりのアミノ基の数によって、ほぼ等しい（7-14%）。1細胞には数多くのプロープと共有的に結合するが(1) μ (10)⁶、これは最も低い非特異的結合しかを示さない。

ネスホルアミダー」結合の観不変性[「チュー・ビー・シー・エフ」(U. S. C. F.)、パー・ラ・ジョー・ニム(Per. L. J.)、及びオーゲル・エル・イー(Agel E. E.)、Feil, L. L. 300, 11, 4512-4527]は、酸加水分解によって架橋結合の解離を固定するのに使用される。架橋結合グループの量は、異なる試料間で11-4512で変化し、特に、4519数字が4570の凍結結合したアローブを有して好ましくいうようである。

本発明者等は、 pH 、室温で1時間の代わりに、 117°C の塩酸溶液中で3時間反応を行うことによって、 1660
位に2個のプロープ残基を結合させることができた。 PVC のカル基数を 0.1 M から 4.1 M まで増殖させると、 1660 位上のプロープ含量が2割減少した(データは添
附されていない)。

一般的地方

400 mg (0.5 g) のマリゴ A (14.8 g) を、1 ml の 1.1 M イミダゾール、107、0.1 ml 10% に溶解させ、5 ml のアミノ酸と混合し、10℃で2時間反応させた。

英語例題

標準的小スケールのタムウ、トリミタロンでカットオフするデフロンフィルターを掛け、粒子を投入し、そしてカラムを廻り立てた。

この招待は、ドナルド・トリッチル(Donald Trichter)氏を含んでおらず、最初のサイクルの最初の工程でこのような化学物質が適用しない場合、生産が停止するので、国産手順に小さな改良を導入した。DTEが導入するまで、通常の100小スケールカラムを使用して合成を形成した。その後、ジョン・アーンボームを手動で停止し、炭酸水素を含む低圧カラムをジョン・アーンボームに入れた。その後、製品の製造過程によって生成されている揮発性化合物プログラムに従った。デプロテクション(deprotection)がファーマシアから提供された。炭酸水素をオキサジド(oxazide)及びカッパ環(1,1,1-trichloro-2,2,2-trifluoroethane)塩溶液で簡単に以下の処理を製造するために使用した。

1' - TCACTGGATTGGTGGGACGCTGCTACACATTCCTGC - 3'

送周明府

材料与方法

溫世隆子

ダイナビーズ H-880 ストレプトアビジン (ダイナル
L.S., 30x150、P-8913 オペロ) を固相担体として使
用した。これらは、 1.5×10^6 の菌数を育しており、スト
レプトアビジンと共付着している単位は超常活性ポリ
マー粒子である。これらは 1.5×10^3 /g の菌体数を有して
いた。

ビネチン結合能力

1 mol の ^{14}C -ピオタン [アークシム (Aerobactin)] を含む 100 μl の 10% (ホスファートと BSA を有する緩衝液) のマトリクス を 0.5 mg の粒子 (0.5 μm の予め洗浄したもの) に担荷し、室温で 15 分間ローリーミキサー (コーンター) に入れた。

6 1961で2国脱身した後、シンガポール計画によって移住した1400人の移住者の割合を調査した。

ゴッホの肖像は、ゴッホの肖像である。

アブライド・バイシステム。§113 DNAシンセサイザー上でチオキチオリゴヌクレオチドを合成した。

化学用品はアブライド・バイオシステム社から購入した。アミノリントールを使用し、ジアミノ改質モノキシオリゴタクトレオチドを製造した。

使用した免疫グロブリンキャパビロブローブは、
 「71144760416676064107060416676071647604-1」
 であった。

マローフのボックスモデル化

実験室によって提供されたように、ジオタン (XLL) エステル [2-エポキシエチル-6-カブロン酸のクロノチック (C14:1) の、ヒスタクシニミル] を使用した。

5.1 μl の水中の 0.1 μmol Pb²⁺ 溶液オリゴ(15)₂₅を 10 μl ラベル付の試液瓶に 1 ml ナトリウム緩衝液添加/試液、pH 7.4 に添加し、検出した。

最後に、シメチルホルムアミド(市販品)のジオキサン

待育4-501059 (12)

1115 エステル (1115 ag/ol) を添加して室温で一晩保存した。

通常のラベル付け剤と製剤液を、セファデックス G5B スピニングカラム (sephadex G5B 1124 column) 中で除去した。Eliass のポリメラーゼ、 α -[1115]-[1115]、及びチンブレートとしてオリゴ (1115)₂₀ による反応中のフィル (1111) を使用して、5' ビオチンオリゴ (1115)₂₀ を寡糖ラベル付け (epiditization) した。通常のラベルをセファデックス G5B スピニングカラムを使用して除去した。

オリゴ (1115) ダイナビーズ (T-ビーズ) の製造

2.5 ml 6 x 10¹⁰ 中の 2100 x ビオチニル化オリゴ (1115)₂₀ (1115 ag/ol) を、10 ml の予め洗浄したダイナビーズ 2x10⁸ ストレプトアビジンと混合し、室温で15分間ローター・シーラー上で保った。

6 x 10¹⁰ 中で2回洗浄した後、ビーズを6 x 10⁸、1.1 x 10⁸ 中で4度で保存した。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成分析

T-ビーズの種々のバッチのハイブリッド形成能力を測定するための機能的分析において、エペンドルフ (ependorf) 管中の0.1 mlのビーズを6 x 10¹⁰、2.15 x 10⁸ で1回洗浄した。マダネットクック (MTC-8、ダイナルファ、オスロ) を造工程間にビーズを滅菌させるのに使用した。

無菌用滅菌瓶の除去後、50 μ l のオリゴ (1115)₂₀ と敬量 (1 ~ 2 x 10¹⁰ ag/ol) の α -[1115]-[1115]-ラベル付オリ

ゴ (1115)₂₀ を含むハイブリッド形成液 (1 x 10¹⁰、0.1 x 10¹⁰) を添加した。

瓶やふに洗浄した後、蓋を蓋型で2分間放置してハイブリッド形成させた。

ハイブリッド形成したビーズを蓋型で2 x 10¹⁰、0.1 x 10¹⁰ を用いて2回洗浄し、オリゴ (1115)₂₀ に対してハイブリッド形成したオリゴ (1115)₂₀ のパーセントをシンチレーション計測器中で測定した。

ポリ (A) mRNA トレーサーのラベリング

3' ポリ (A) タールを有する 1 x 10¹⁰ 中の 1000 bp mRNA (プロメガ) を、10 μ l 5 x Elenix 緩衝液、1 u 22' アシン (Klenow)、15 mM 10¹⁰ 中の 2.5 mM オリゴ (1115)₂₀ と混合した。室温で2分間、10 mM α -[1115]-[1115]、1 u Elenix ポリメラーゼ (アマーシャム) 及び 50 μ l までの水を添加し、15℃で15分間反応を続けた。通常の α -[1115]-[1115] をセファデックス スピニングカラムを使用して除去した。

オリゴ (1115)₂₀ と混合したダイナビーズ 2x10⁸ ストレプトアビジンに対するポリ (A) mRNA ハイブリッド形成用組成液

ポリ (A) 結合緩衝液:

0.5M LiCl、100 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA、0.1 mM 2-メルカプトエタノール。

中間緩衝液:

0.15M LiCl、100 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA、

0.1 mM 2-メルカプトエタノール。

抽出緩衝液 100 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA、0.1 mM 2-メルカプトエタノール。精製 mRNA のその他の用途に応じて、最後の滅菌工程と抽出緩衝液中の EDT を省略できる。

全 mRNA の抽出

細胞系培養液からの全 mRNA の抽出は、オーフレイ (Offrey) とロージョン (Rigdon) のプロトコル (1980, Exp. Cell Res. 121, 313 ~ 314) に従って、サルコニル (sarcosyl) 法、15℃、緩衝液を使用して行った。

mRNA のカップリングとハイブリッド形成能力

本稿の実験において使用したダイナビーズ 2x10⁸ ストレプトアビジンは、粒子 10⁸ 当たり 10¹⁰ ag/ol の 5' C-ビオチンに結合したことが判明した。

結合した 5' ビオチニル化オリゴ (1115)₂₀ の量は、カップリング反応中にラベル付けしたトレーサーを測定して測定し、粒子 10⁸ 当たり 210 μ g/ol の ビオチンオリゴ (1115)₂₀ であることが判明した。

これらの特性オリゴ (1115)₂₀ 粒子の最大ハイブリッド形成能力を決定するために、材料と方法において記載したような (1115)₂₀ オリゴヌクレオチドを使用して分析を測定した。

本稿の研究において製造し使用した T-ビーズのバッチは、10¹⁰ ag/ol オリゴ (1115)₂₀ のハイブリッド形成能力を有していることが判明した。

非特異的結合を測定するための対照実験において、非特異的アローブ (1115) (1115 アローブ) とカップリングした粒子は、粒子 10⁸ 当たり 10¹⁰ ag/ol オリゴ (1115)₂₀ 未結合に結合しなかった。

オリゴヌクレオチド上のハイブリッド形成速度論

通常的に mRNA 単離実験を同時にする前に、この系のハイブリッド形成速度論を研究することが必要であった。

通常のオリゴ (1115)₂₀ 特定のヌクレオチドに対して各過剰濃度の T-ビーズハイブリッド形成能力を使用して、ハイブリッド形成速度を測定した。

第1期が示すように、ハイブリッド形成は1分以内で完了した。

オリゴヌクレオチド上のハイブリッド形成速度

どの程度効率的に特異的濃度が混合から分離できるかを試験するために、氷解明を5分2つの異なる濃度を組み立てた。

第1の実験においては、徐々に量を増やしながら持つかの量の特定のオリゴヌクレオチド (オリゴ (1115)₂₀) を、公知の最大ハイブリッド形成能力 (10¹⁰ ag/ol) を有する固定量 (10¹⁰ μ l) の T-ビーズに添加した。第2回の実験は、特定の T-ビーズ能力の比率が 1 : 1 に近づいた場合で、T-ビーズは少なくとも10分の1の特定のオリゴヌクレオチドと結合できることを示している。

第2の実験において、10¹⁰ ag/ol から 10¹⁰ ag/ol までの5つの異なる濃度のオリゴ (1115)₂₀ を 10¹⁰ μ l の粒子の

1959 (13)

エドワード・テイラーの『原始文化』のハイブリッド思想
の源流と展開

ホーフレらの上述の方法を使用して、ハイブリドーマ細胞系 (1er) 481(13) の L⁺10⁸ 細胞から全反DNAを抽出した。オリゴ(41)種子に対するcHcDNAハイブッド形成の温度論争、10⁴モルの全反DNAを重量の200ナノグラム付けたマウスの解凍ポリA⁺ cDNAとともに、そして150 μlのハイブッド形成緩衝液中の約5倍過剰のT-ブース推力を使用して、実行した。第8図中の行集は、タンパク中のポリA⁺ cDNAの80%近くが2分以内にピーズに所与にハイブッド形成し、また14秒後には18%が既にハイブッド形成していることを示している。

細胞質 (cytoplasm) からの mRNA と RRNA の直接翻訳
の開始

ハイブリッドマ細胞系 III の培養液からの 10% 高濃縮
；度処理し、 $10 \mu\text{l}$ 75% [ドゥルベッコ (Dulbecco),
B41-04390] 中に再分散させ、トリトン [Triton] X-100
を 0.5% 添加し、4°C で凍結した。1 分間のリンス
[17145] の後、細胞を含む懸液デブリスを、ニッペン
ドープ (Nipendope) 凍心分離機で 10 秒間スピニングで
ペレット化した。上清液を、2 時間 100% のハイブリ
ド形成培養液中の 10% に希釈し、2 分間静置してハイ
ブリッド形成させ、その後細胞を遊離的に分離させた。
ハイブリッド形成した細胞を 2 日 20°C 15% で培
子から切り取り、細胞を洗淨液で洗淨して除去した。この

アリコートに添加した。落合会館の中に存在する雄蝶の数を、和歌山のオリゴマクレオチドを含むアロープで19901まで調製した。雄的オリゴマクレオチドを含むあるいは特定の別同定数においては、非特異的結合を決定できるように、非特異的アロープをミセル付与した。2分間のハイブリッド形成後、2段階の洗浄工程を行い、ハイブリッド形成したオリゴ(44)の量を測定した。第2段階の洗浄後、100:1000のような低い濃度のオリゴマクレオチドで(存在する全雄蝶の1%程度)でも、雄的オリゴ(44)の活性は95%以上を引き出すことを示した。

時り人 市民の人々を養育の事柄

(11) α -ダイチロース結合メチル RMA の能力、溶解性、および触媒活性、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成に關して比較したような簡便な比較試験を相対立てることによって察見した。

4-ベンゼンの最大ポリマー化反応を防止するために、1'末端に10 g/l含有する1800クロオチドカチマイレン配座(プロシガ)である発酵の菌種の1'-ベンゼン付着された細胞膜RNAを使用した。最も強力を決定するたための方社は、オリゴヌクレオチド結合分長に關して既知したのと同様であるが、上述のハイブリッド形成過程を阻害した。

この特定のポリ A sum RNA の結合能力は、i-ドーズ 2 ml 当たり 100 μl (1.5%) の m RNA であることが判明した。

実験においては、15°ハイブリッド角範囲のテリコート
を、可成厚、500 μ 、100 μ 、50 μ 、20 μ と、
のT-ピースと、ブローヤしの144 μ のダイナビ
ズ 3311-ストレートアビジンに添着した。T-ピースか
ら切り出した後、ポリマR N Aのノーチングブロッ
ク (Notching Block) からのスプレッドフィルムをデシントメ
ーターでスキャンし、炭酸ダクロリンキャパシタアブロー
で処理した。これらの結果は、図11 A の図表がピー
ク強度が増加するとともに増加し、一方上層皮中の炭素
m R N A がそれに対応して減少することを示している。図
12 中に表示されている結果は、約150 μ のT-ピース
が15°範囲からの純物質ポリマ m R N A の116より多
くを溶解するのに十分であることを示している。図中の
記号—ム—は格子に対するハイブリッド形成を渡し、記
号—○—は上層皮中に溶解しているm R N A を表す。ブ
ローヤを用いていないストレートアビジン格子は換算可
能なm R N A 割合を殆どなかった。

2000

日本D-1000系「ラジエイト」(スウェーデン、ストックホルムのジョー・アイン製造) : 1100から改良された)からのMRNの増設

カーブレーンによってFig. 1, Blocken 117, 303 ~ 116 (117)に記録されている方法によって、 1×10^6 個菌から食肉DNAを抽出した。この方法に従って、0.1 mlの超純ペレットを、3 ml氷冷分液 (Isol) 濃度 [3

Y LEC1、6 は 厚皮、0-1 はサルコシル (sarcosyl)、
0-1 は 2-メルカプトニチノール、B1 は トリス-BE1、
D1、F、5 は BE1D1) に追加した。その後、混合剤を各
官能処理し、冬上で一晩保持した。

翌日、分昇精を1.0501で24時間過心分離した。ペ
レットを速やかに Fe-SO_4 (10 ml H_2O 1 ml H_2SO_4 , 0.5
% FeCl_3) に溶解させ、同体積のフェニール・クロロホルム
(1:1) で1:1値抽出し、その濃度クロロホルムの方であ
る上層抽出した。分昇精を3倍体積のエタノールと1/3
体積の3 M NaAc と混合し、1940パッチに分配し、そし
て使用するまで-20℃で保存した。

1. [47] 船舶に相当する全RNMのパッチの1つに、
ユニアキスによって1932に1917~1919年に記載された方
位に従って、オランダの「R-セルロール」を使用する従来の
RNM複製法を改良した。

金沢市のもう一つのバッチを以下の2名日本人被爆者
氏に就いて適用した。

DNA合成機(アサライ・バイオシステムズ製)によって製造された、構造式(H₈)-(H₂)₁₁-dGCTTGGAGATTCCTCCCGCCTCAATTA(T)₁₀を有するPBと命名されているDNAプローブを、21 ngのP303粒子、54 ngの遊離DNAプローブ、2.1 μlの0.1 Mイミダゾール緩衝液(pH 7.0 中の0.6 M)のEDC/ジマメシと混合することによって、(前記述)カルボキシ基に結合して陽性粒子P351に結合させた。一反応後、1.5℃(上述のもの)で2時間

予を脱出し、 0.2×10^{18} 、 0.5×10^{18} の中で 1 図を得て、 8 ps のオズダム、プローブをハイブリッド形成させる能力が与えた。 0.5×10^{18} の腔子を 10 ps の、プローブ（ナノレーザー）反応によって、 70 ps でサベル付はれている）とも、 1 ps 中で 10 ps 維持することによって、ハイブリッド形成能力が形成した。 10 ps （腔子より） 10 ps 低い）において、 0.5×10^{18} の同腔子を脱出した後、全腔部量に対するハイブリッド形成した人々の割合をシミュレーション計測値で測定した。

用 R N 人権の爲の対原物として、配列

$\text{HN}_2-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH})_2-\text{HN}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{YTAATATCAGTGTAAAGCTTCTCTGT}$
 $165\text{AGCTTTTGGGCGTAAAGCAAAACG-3'}$ を知り、この塩基配列と
 いる無関係のプローブを上述の方法によって標子と結合
 させた。

ラジ [Brij] m R N A トレーサーを 0.1 ml を加えて取
制使うべし。付加することによって調製し、m R N A を上
述の能率増によって精製した。ダブル付加は、10 ml 5
% 1.5% ポリメラーゼ緩衝液 (0.25 M KCl, 0.25 M
Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂) 中で 15 分間、1
μmol の P31-プローブを m R N A に対してハイブリッド
形成させることによって行った。j k s k i d - [P31] d A T P
(アマージム)、2 塩位の 1.5 mM ポリメラーゼを (0.01)
をこの混合剤に添加し、これを 55°C で 1 時間で精製し
た。2 時間凍結した後、凍結物をセファックス C55
(ファーマシア) に滴して組み立てられた。4 グレイド

1) 1,4-ジオキサタン-2-オキシドを使用して、存在する唯一のタケレ
オキシドとしてのビネチン-2(2)でビネチン化しな(マ
ニアチン、116 ~ 117を参照のこと)。ビネチンは111
部位においてのみ組み入れられる。第1のプライマー-
結合の配列データに基づくものであり、5'-GGA-AAT-GGA
-GTA-GCA-TAT-G-であった。

組み入れられなかったビオ-0071を映画するために、0-11セファロサックススピンカラムを使用して材料を精製し「マニエラス 181頁」、エタノールで析出させた（エタノールによる析出はあまりに苛酷である）。ビオチニル化された二重鎖DNAを含む混合物を、PE膜管（1.6×10³ m トリス20 mM及び1.0 M NaCl）中のストレプトアビジン/アビジン複合体を柱より、速度で34分間液相中に浸漬（immersion）させて、浸出した。15k¹の粒子（25%塩析/0.1）当たり2本のビオチニル化DNAを供出した。

重合したビニルモノ化二重鎖のDNAを ^{32}P でラベルした。中国語でその同位体を使った。一正鎖DNAを作る核子も電荷を使用して図示し、12核素成分でも同位体した。

聖訓集覽

配列決定用マシンのローディング：

2.1 の時: 留声/ハイブセーフ形式 (100 00、トリ
ス) 10.0、10 00 254 (1001)

1 度 1 回 の 吸 入 量 (1.2 μg/m)

チドを睡業した。

而且 N 人作製實驗は以下のように行つた。

RTF プローブを有する分子 10 を、161 μm の 100 μm 中 100, 400, 1000 のトレース=ミリメートルとともに、
日知館系ラジオからの全 RTN の 10 μm に電流した。

同じ実験を行ったが、原子は1eV プローブを有していた。

ハイブリッド形成は装置でローラーマシン (roller machine) 上で行った。ハイブリッド形成反応の速、低い温度で、岩石によって粒子を減量させ、上置版中の熱質放射能を測定した。熱測定の後、粒子をすぐに再分散させた。

10分後、 π^- R N A の50%が E1 プローブを有する陽子に結合した。対照粒子は殆ど可能な量の R N A に結合しなかった。

30分間の保持後、結子を直線で500 μ l 2 r 350で2
回洗浄し、100 μ l 1% 炭酸液中で充分融かし、酸手を
減量させ、上澄液を回収し、-70℃で凍結した。

商標圖 7

本発明の方柱を、本発明者らの新発所でタローン化したリシン (Pill) A 増量子の日本製の製造便利決定を行うために使用した。

13281 断片上のラシンを $\text{pH} 8.0$ でクロン化した。この遺伝子の挿入場所は以前に配列決定されている。プラスミド pRL101 を $\text{pH} 8.0$ の CaCl_2 溶液を用いて切断し、

1.4 21 鹽糖水

を含む混合物を粒子に添加し、51℃で5分間保持し、その後ゆっくりと室温まで冷却した。

アニールした粒子テンプレートブライマーに以下のものを添加した。

1.6 m l 247.1 ml, 661 (1/m net)

Re: NEW L. B. #1 (4 Pgs)

15d 1 0 2 1 (100 2 1 (101 2 2 2 1)

22) を代わり可以使用である。

全混合物を、A、G、C、及びアとラベル付けされた、4つのミクロ透析分析チューブ又はミクロ測定プレート中の液体相に（ケル（cell））に分配した。即ち、（粒子の体積のために）毎々4μmずつに分けた。

4 ユリの異なるヌクレオチドを各チューブ／ウェル混合液、即ち、A ミックス (ais)、C ミックス、G ミックス、及び T ミックスに添加した。

А з ы р а : 100 мм дѣтѣ, дѣтѣ, 161РД

1004 m d n t p

Q 主 要 元 素 : 5 号 钢 45Cr: 100μm 4770、45Cr 200
12μm 45Cr

CEX: 106 山形 457P、477P、106 山形 407P 及び

10600 PICT

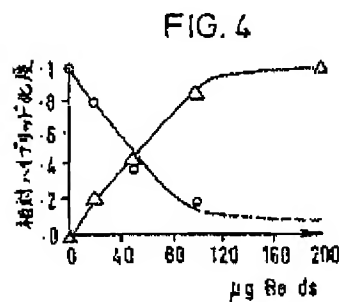
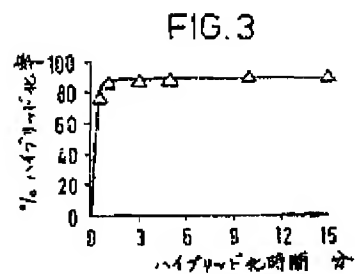
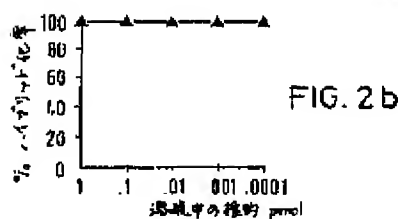
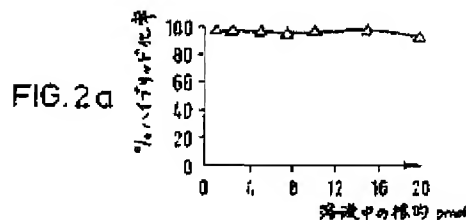
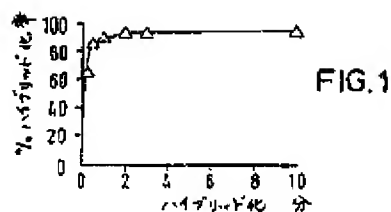
工具とタヌ: 100 μm 0.57P, 1 μm 0.57P, 100 μm

АСТР 28 СР 3004 8 40777

観念を掌握して分間取用して居った。

9/4/2008 11:55 AM

鄂政平 4-501959 (18)

[illegible]

SECRETARY GENERAL BAL OF OF RESEARCH INFORMATION WITH THE UNITED STATES		
Category	Source of Report - with address, name, company, if the report is from a company	Date of Report
X	EP, A, 0281399 (CYKE et al.) 7 September 1967 see the whole document	1.8-11
Y	"	2-7, 15, 20
Y	"	"
Y	WQ, A, 09704572 (BACON INTERNATIONAL INC) 18 May 1968 see the whole document	1.8-11
Y	"	2-7, 15, 20
X	WQ, A, 09704572 (ADVANCED MAGNETIC, INC.) 7 September 1968 see the whole document, especially pages 1-1, 20, 21; claims 1-7 4 EP, A, 0672040 (ited in the Application	1.8-11
Y	"	2-8, 23, 25 30, 32
Y	"	"
Y	Nucleic Acids Research, vol. 15, no. 7, 1969, 181 Press Limited, Oxford, GB, S. Sussk et al.: "Fold phase DNA sequences coding the biotin-uracil system", pages 3035-3038, see the whole article, especially page 3037, paragraph 1	1-11, 17-20
Y	"	"
Y	EP, A, 0210756 (EPSTEIN INC.) 5 August 1967 see the whole document	1-11, 23, 25
Y	"	"
Y	EP, A, 0214139 (THE UNIVERSITY OF CHICAGO) 1 June 1967 see the whole document	1.8, 17-20
Y	"	"

75 卷 44 · 501353 (97)

<p>114. 11/19/1948, 11/20/1948, 11/21/1948, 11/22/1948, 11/23/1948, 11/24/1948, 11/25/1948, 11/26/1948, 11/27/1948, 11/28/1948, 11/29/1948, 11/30/1948, 12/1/1948, 12/2/1948, 12/3/1948, 12/4/1948, 12/5/1948, 12/6/1948, 12/7/1948, 12/8/1948, 12/9/1948, 12/10/1948, 12/11/1948, 12/12/1948, 12/13/1948, 12/14/1948, 12/15/1948, 12/16/1948, 12/17/1948, 12/18/1948, 12/19/1948, 12/20/1948, 12/21/1948, 12/22/1948, 12/23/1948, 12/24/1948, 12/25/1948, 12/26/1948, 12/27/1948, 12/28/1948, 12/29/1948, 12/30/1948, 12/31/1948, 1/1/1949, 1/2/1949, 1/3/1949, 1/4/1949, 1/5/1949, 1/6/1949, 1/7/1949, 1/8/1949, 1/9/1949, 1/10/1949, 1/11/1949, 1/12/1949, 1/13/1949, 1/14/1949, 1/15/1949, 1/16/1949, 1/17/1949, 1/18/1949, 1/19/1949, 1/20/1949, 1/21/1949, 1/22/1949, 1/23/1949, 1/24/1949, 1/25/1949, 1/26/1949, 1/27/1949, 1/28/1949, 1/29/1949, 1/30/1949, 1/31/1949, 2/1/1949, 2/2/1949, 2/3/1949, 2/4/1949, 2/5/1949, 2/6/1949, 2/7/1949, 2/8/1949, 2/9/1949, 2/10/1949, 2/11/1949, 2/12/1949, 2/13/1949, 2/14/1949, 2/15/1949, 2/16/1949, 2/17/1949, 2/18/1949, 2/19/1949, 2/20/1949, 2/21/1949, 2/22/1949, 2/23/1949, 2/24/1949, 2/25/1949, 2/26/1949, 2/27/1949, 2/28/1949, 2/29/1949, 2/30/1949, 3/1/1949, 3/2/1949, 3/3/1949, 3/4/1949, 3/5/1949, 3/6/1949, 3/7/1949, 3/8/1949, 3/9/1949, 3/10/1949, 3/11/1949, 3/12/1949, 3/13/1949, 3/14/1949, 3/15/1949, 3/16/1949, 3/17/1949, 3/18/1949, 3/19/1949, 3/20/1949, 3/21/1949, 3/22/1949, 3/23/1949, 3/24/1949, 3/25/1949, 3/26/1949, 3/27/1949, 3/28/1949, 3/29/1949, 3/30/1949, 3/31/1949, 4/1/1949, 4/2/1949, 4/3/1949, 4/4/1949, 4/5/1949, 4/6/1949, 4/7/1949, 4/8/1949, 4/9/1949, 4/10/1949, 4/11/1949, 4/12/1949, 4/13/1949, 4/14/1949, 4/15/1949, 4/16/1949, 4/17/1949, 4/18/1949, 4/19/1949, 4/20/1949, 4/21/1949, 4/22/1949, 4/23/1949, 4/24/1949, 4/25/1949, 4/26/1949, 4/27/1949, 4/28/1949, 4/29/1949, 4/30/1949, 5/1/1949, 5/2/1949, 5/3/1949, 5/4/1949, 5/5/1949, 5/6/1949, 5/7/1949, 5/8/1949, 5/9/1949, 5/10/1949, 5/11/1949, 5/12/1949, 5/13/1949, 5/14/1949, 5/15/1949, 5/16/1949, 5/17/1949, 5/18/1949, 5/19/1949, 5/20/1949, 5/21/1949, 5/22/1949, 5/23/1949, 5/24/1949, 5/25/1949, 5/26/1949, 5/27/1949, 5/28/1949, 5/29/1949, 5/30/1949, 5/31/1949, 6/1/1949, 6/2/1949, 6/3/1949, 6/4/1949, 6/5/1949, 6/6/1949, 6/7/1949, 6/8/1949, 6/9/1949, 6/10/1949, 6/11/1949, 6/12/1949, 6/13/1949, 6/14/1949, 6/15/1949, 6/16/1949, 6/17/1949, 6/18/1949, 6/19/1949, 6/20/1949, 6/21/1949, 6/22/1949, 6/23/1949, 6/24/1949, 6/25/1949, 6/26/1949, 6/27/1949, 6/28/1949, 6/29/1949, 6/30/1949, 7/1/1949, 7/2/1949, 7/3/1949, 7/4/1949, 7/5/1949, 7/6/1949, 7/7/1949, 7/8/1949, 7/9/1949, 7/10/1949, 7/11/1949, 7/12/1949, 7/13/1949, 7/14/1949, 7/15/1949, 7/16/1949, 7/17/1949, 7/18/1949, 7/19/1949, 7/20/1949, 7/21/1949, 7/22/1949, 7/23/1949, 7/24/1949, 7/25/1949, 7/26/1949, 7/27/1949, 7/28/1949, 7/29/1949, 7/30/1949, 7/31/1949, 8/1/1949, 8/2/1949, 8/3/1949, 8/4/1949, 8/5/1949, 8/6/1949, 8/7/1949, 8/8/1949, 8/9/1949, 8/10/1949, 8/11/1949, 8/12/1949, 8/13/1949, 8/14/1949, 8/15/1949, 8/16/1949, 8/17/1949, 8/18/1949, 8/19/1949, 8/20/1949, 8/21/1949, 8/22/1949, 8/23/1949, 8/24/1949, 8/25/1949, 8/26/1949, 8/27/1949, 8/28/1949, 8/29/1949, 8/30/1949, 8/31/1949, 9/1/1949, 9/2/1949, 9/3/1949, 9/4/1949, 9/5/1949, 9/6/1949, 9/7/1949, 9/8/1949, 9/9/1949, 9/10/1949, 9/11/1949, 9/12/1949, 9/13/1949, 9/14/1949, 9/15/1949, 9/16/1949, 9/17/1949, 9/18/1949, 9/19/1949, 9/20/1949, 9/21/1949, 9/22/1949, 9/23/1949, 9/24/1949, 9/25/1949, 9/26/1949, 9/27/1949, 9/28/1949, 9/29/1949, 9/30/1949, 10/1/1949, 10/2/1949, 10/3/1949, 10/4/1949, 10/5/1949, 10/6/1949, 10/7/1949, 10/8/1949, 10/9/1949, 10/10/1949, 10/11/1949, 10/12/1949, 10/13/1949, 10/14/1949, 10/15/1949, 10/16/1949, 10/17/1949, 10/18/1949, 10/19/1949, 10/20/1949, 10/21/1949, 10/22/1949, 10/23/1949, 10/24/1949, 10/25/1949, 10/26/1949, 10/27/1949, 10/28/1949, 10/29/1949, 10/30/1949, 10/31/1949, 11/1/1949, 11/2/1949, 11/3/1949, 11/4/1949, 11/5/1949, 11/6/1949, 11/7/1949, 11/8/1949, 11/9/1949, 11/10/1949, 11/11/1949, 11/12/1949, 11/13/1949, 11/14/1949, 11/15/1949, 11/16/1949, 11/17/1949, 11/18/1949, 11/19/1949, 11/20/1949, 11/21/1949, 11/22/1949</p>

	Document Number	Page No.
Y	NY 67-11548 (C. FAVELSKI) A. CROOKED 1958 see document; Section 5	10
P, X	NY 68-11546 (C. FAVELSKI) 16 November 1958 see the whole document	1-18
T	NY 68-0928 (M. GILMAN) 8 October 1959 see the whole document	1-19

[illegible]

PAGE 02

REF ID: A68974

SCOTT/ISA/218

Revised 7/80

The present invention teaches the use of monodisperse superparamagnetic particles emulsified with a plurality of suitable solid molecules in hypodermic injections. For the subject matter to form a unitary concept, it would be necessary that the general inventive concept as described should not have been disclosed in its prior art. In this regard, the general problem underlying the invention is new, novel and a solution to it has already been found in the state of art as illustrated by the cited art.

This solution, the use of superparamagnetic particles emulsified with at least one magnetic fluid probe molecule and which are capable of substantial homogeneous dispersion within a same medium whose beads are spherical and generally have a diameter of one micron, see page 4, lines 35-44, and page 6, lines 7-10. By describing the particles as symbols of chemical composition dispersible, EP 344,242 completely describes a dispersion whose properties are substantially uniform in nature, i.e., the dispersion comprises substantially similar or approximately identical particles whose size is accordance with the usual usage of "substantially homogeneous". Thus EP 344,242 defines particles whose distribution properties fall within the scope of those defined herein, the quantitative characteristics of which are not stipulated.

Indeed, in US 4,654,276 and US 4,734,773, both of which are incorporated in the application by reference and quoted in their entirety, the term "monodispersity" is used liberally to describe particles having approximately the same size, for instance a standard deviation of less than 1% as in US 4,654,276, column 8, lines 3-6, and in US 4,734,773 example 1, line 44; the term "polydispersity" is used for particles having a standard deviation of 10%. Therefore, the above solutions proposed for the problem as previously known and solved no longer concern to a common inventive concept. The search has been restricted. As a result, to the first topic identified,

